

10-031806

REC'D 17 AUG 2000	
WIPO	PCT

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP 00 / 06832

**Bescheinigung**

E J K L

---

Herr Dr. Ingo K l i m a n t in Regensburg/Deutschland hat eine Patentanmeldung  
unter der Bezeichnung

---

"Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel als Referenz-  
standard und Phosphoreszenzmarker"

am 15. Juli 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete-Stück-ist-eine-richtige-und-genaue Wiedergabe der ursprünglichen  
Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 09 K und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 30. Mai 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 33 104.9

Dzierzon

**BEST AVAILABLE COPY**

# Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel als Referenzstandard und Phosphoreszenzmarker

## Zusammenfassung

Das Patent beschreibt die Zusammensetzung, Herstellung und Verwendung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln. Diese Partikel können entweder als interne Phosphoreszenzstandards zur Referenzierung von Fluoreszenzsignalen, oder als Phosphoreszenzmarker zur Markierung und Detektion von Biomolekülen verwendet werden. Phosphoreszenzfarbstoffe werden in inerte Form in feste Materialien eingebaut, das heißt ~~von Einfluß von chemischen und biologischen Verbindungen in wässrigen~~

Probenbestandteilen abgeschirmt. In dieser eingebauten Form bleiben die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe (spektrales Verhalten, Phosphoreszenzquantenausbeute, Phosphoreszenzabklingzeit und Polarisation) von wechselnden Probenparametern unbeeinflusst.

Als Einbaumatrix werden dichte anorganische Materialien oder organische Polymere ausgewählt, die aufgrund ihrer Struktur die Aufnahme von Biomolekülen kleinen neutralen Molekülen sowie ionischen Verbindungen ausschließen. Insbesondere der störende Einfluß von molekularem Sauerstoff, einem effizienten Phosphoreszenzlöcher, auf Phosphoreszenzmessungen wird auf diese Weise eliminiert. Die Oberfläche der Nano- und Mikropartikel kann mit reaktiven Oberflächen versehen sein, um die kovalente Kopplung von Biomolekülen zu ermöglichen und das Aggregieren der Partikel zu eliminieren.

## Patentansprüche

1. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel, dadurch gekennzeichnet, daß lumineszierende Metall-Liganden Komplexe mit langen Lumineszenzabklingzeiten in feste Materialien Form eingebaut werden, so daß sie gegenüber chemischen Parametern der Probe abgeschirmt sind und deren Lumineszenzeigenschaften wie Quantenausbeute, spektrales Verhalten Lumineszenzabklingzeit und Polarisationsgrad von der jeweiligen Probenzusammensetzung unabhängig sind.
2. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Metall-Liganden-komplexen um Verbindungen des Ruthenium(II), Osmium(II) Rhenium(I), Iridium(III) Platin(II) und Palladium(II) als Zentralatom handelt.

3. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um Komplexe mit 2 oder 3-zähligen Polypyridylliganden wie 2,2'-Bipyridin, Bipyrazin, Phenanthrolin, Terpyridyl oder deren Abkömmlinge handelt.
4. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um die Tris-komplexe des Ruthenium(II) mit 2,2'-bipyridyl, 1,10-phenanthrolin, 4,4-diphenyl-2,2'-bipyridyl und 4,7-diphenyl-1,10-phenantrolin als Liganden handelt.
- ~~5. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um Carbonylkomplexe von Re(I) mit zusätzlichen Diiminliganden wie Abkömmlinge von 2,2'-Bipyridyl und 1,10-Phenanthrolin handelt.~~
6. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den lumineszierenden Verbindungen um Porphyrinkomplexe des Pt(II) sowie Pd(II) als Zentralatom handelt, die sich durch intensive Raumtemperaturphosphoreszenz auszeichnen.
7. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Einbaumatrix um organische Polymere handelt, die sich durch geringe Wasseraufnahme sowie minimaler Gaspermeabilität auszeichnen.
8. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Einbaumatrix um organische Polymere aus der Gruppe der Polyacrylnitrile, Polyacrylcopolymere, Polyvinylchlorid oder Polyvinylidenchlorid handelt.
9. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche der Partikel durch reaktive Gruppen wie COOH, NH<sub>2</sub>, OH oder SH modifiziert ist, welche die kovalente Kopplung von Fluoreszenzindikatoren und Biomolekülen ermöglichen.
10. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Einbaumatrix um Gläser handelt.

11. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Einbaumaterialien um Gläser handelt, die nach dem Sol-Gel Verfahren hergestellt werden.
12. Phosphoreszierende Mikro- und Nanopartikel nach Anspruch 11 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Einbaumaterialien um Sol-Gel Gläser handelt, die aus Silizium, Titan, Zirkonium oder Zinn-tetraalkoholaten hergestellt werden.
13. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 1 wobei die Partikel aus einer Polymerlösung in welcher der phosphoreszierende Farbstoff gelöst vorliegt, durch Zutropfen von Wasser ausgefällt werden.
14. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 13 wobei die Partikel aus einer Lösung bestehend aus Dimethylformamid und Polyacrylnitril in welcher der phosphoreszierende Farbstoff gelöst vorliegt, durch Zutropfen von Wasser ausgefällt werden.
15. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 14 wobei der Durchmesser der Partikel durch Variation des Polymergehaltes der Polymerlösung definiert eingestellt wird.
16. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 1 wobei der Farbstoff in bereits vorgefertigte Partikel aus einem Lösungsmittelgemisch durch Diffusion eingebaut wird.
17. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 1 wobei die Partikel durch Versprühen einer Polymerlösung in welcher der Lumineszenzfarbstoff gelöst vorliegt und gleichzeitiger Verdampfung des Lösungsmittels entstehen.
18. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln nach Anspruch 17 wobei der Durchmesser der Partikel durch Variation des Polymergehaltes der Sprühlösung definiert eingestellt wird.

19. Verfahren zur Herstellung von phosphoreszierenden Mikropartikeln wobei der Lumineszenzfarbstoff in verdichtete monolitische Sol-Gel Gläser eingebaut wird, welche anschließend gemahlen und nach Größen fraktioniert werden.
20. Verwendung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel nach den Ansprüchen 1-12 zur Markierung und fluorimetrischen Detektion von Biomolekülen aus der Gruppe der Toxine, Hormone, Hormonrezeptoren, Peptide, Proteine, Lektine, Oligonukleotide, Antikörper, Antigene, Viren und Bakterien.
21. Verwendung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel nach den Ansprüchen ~~1-10 als Referenzstandards zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen~~ von fluorimetrischen Assays.
22. Verwendung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel nach den Ansprüchen 1-10 zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätsassays wobei durch die Zugabe des Referenzstandards zur Probe die Intensitätsinformation in ein Phasensignal oder einen zeitabhängigen Parameter konvertiert wird.
23. Verwendung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel nach den Ansprüchen 1-12 ~~zur Referenzierung des Fluoreszenzintensitätssignals von optischen~~ Fluoreszenzsensoren wobei die Partikel mit dem Fluoreszenzindikator in einer festen Phase gemeinsam immobilisiert werden.

### *Hintergrund der Erfindung*

Die Messung der Lumineszenz ist eine weit verbreitete Methode in der Bio- und Chemoanalytik. Ihre Attraktivität verdankt sie ihrer hohen Empfindlichkeit, der Vielseitigkeit sowie der Eliminierung der Strahlenbelastung durch radioaktive Markierungsreagenzien. In der Praxis werden in der Regel Fluoreszenzmarker eingesetzt, die sich durch eine hohe Quantenausbeute auszeichnen eingesetzt. Meist wird die Korrelation zwischen Fluoreszenzintensitätssignal sowie der Konzentration des Fluoreszenzmarkers in der Probe als Meßparameter ausgewertet. Nachteilig wirkt sich bei solchen Messungen aus, daß die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität durch eine Vielzahl von Faktoren gestört wird. Dabei kann es sich zum einen um Schwankungen der Intensität im optischen System (Lichtquelle, Detektor und optischer Weg) aber auch um intrinsische optische Eigenschaften der Probe handeln (Färbung, Trübung und Untergrundfluoreszenz) handeln. Um diese Störeinflüsse zu eliminieren, benötigt man effiziente Methoden zur Referenzierung der Fluoreszenzsignale. Eine kürzlich patentierte Methode zum Referenzieren von

Fluoreszenzsignalen beruht darauf, daß zur Probe ein phosphoreszierender Referenzstandard zugegeben wird, der ähnliche (im besten Fall identische) spektrale Eigenschaften wie der eigentliche Fluoreszenzmarker aufweist. In Kombination mit einer Frequenzmodulations- oder zeitaufgelösten Lumineszenzmessung wird auf diese Weise die Intensitätsinformation in ein Phasensignal oder einen zeitabhängigen Parameter umgewandelt. Um auf diese Weise eine fehlerfreie Referenzierung des Meßsignals zu realisieren, werden inerte phosphoreszierende Referenzstandards benötigt, deren Phosphoreszenzeigenschaften von den Probenparametern nicht beeinflußt werden. Dafür kommen zum Beispiel phosphoreszierende anorganische Feststoffe wie zum Beispiel mit Cr(III) dotierte Mischoxide in Frage, die in gepulverter Form der Probe zugemischt werden

~~können. Besser geeignet für diesen Zweck sind jedoch Phosphoreszenzfarbstoffe, die in~~  
organische und anorganische Trägermaterialien eingebaut werden und in Form von Mikro- oder Nanopartikeln der Probe zugemischt werden. Dabei kann es sich um lumineszierende Polypyridylkomplexe mit Ru(II), Os(II), Re(I), Pt(II) oder Ir(III) als Zentralatom, oder phosphoreszierende Porphyrine des Pt(II) oder Pd(II) oder Komplexe der Seltenerdenmetalle wie Tb(III) oder Eu(III) handeln.

Eine weitere weitverbreitete Methode um lumineszenzmarkierte Moleüle sehr empfindlich und ohne Störung durch Eigenfluoreszenz der Probe nachzuweisen, besteht darin, Lumineszenzmarker zu verwenden, die sich durch lange Abklingzeiten auszeichnen. Deren Signal läßt sich durch zeitaufgelöste-Messung leicht vom Untergrundsignal abtrennen. Es können wiederum dieselben Phosphoreszenzfarbstoffe zum Einsatz kommen.

Für beide beschriebenen Methoden ist es notwendig, daß die photophysikalischen Eigenschaften des Phosphoreszenzfarbstoffs nicht von den Probenparametern beeinflußt werden. Werden solche Farbstoffe der Probe im gelösten Zustand zugegeben, sind diese Voraussetzungen nicht gegeben. Insbesondere Phosphoreszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff sowie oxydative und reduktive Löscher bewirken Fehlinterpretationen des Meßsignals.

Um inerte Phosphoreszenzstandards und Phosphoreszenzmarker zur Verfügung zu haben, müssen die Phosphoreszenzfarbstoffe in feste Materialien eingebaut werden, damit sie mit der Probe nicht in Wechselwirkung treten können.

Die Erfindung beschreibt sowohl die Zusammensetzung von phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikeln deren photophysikalische Eigenschaften nicht von der Zusammensetzung der Probe abhängen als auch Verfahren zu deren Herstellung. Es werden außerdem Anwendungsmöglichkeiten als Phosphoreszenzstandard und Phosphoreszenzmarker beschrieben.

Als geeignete Einbettungsmaterialien für phosphoreszierende Farbstoffe haben sich Gläser erwiesen, die nach dem Sol-Gel Verfahren hergestellt werden. Die Herstellung solcher Gläser nach Standardmethoden führt zu Materialien, die durch eine mikroporöse Struktur gekennzeichnet sind. Eingebaute Farbstoffe sind damit für gelöste Probenbestandteile und insbesondere Sauerstoff zugänglich und können damit gelöscht werden. Die in dieser Erfindung beschriebenen Sol-Gläser werden aus diesem Grund durch Erhitzen auf eine Temperatur von 200°C in einem besonderen Schritt der Herstellung verdichtet. Nach der Hydrolyse des Sol-Gel Precursors Tetamethoxysilan wird unter Vakuum sofort das Lösungsmittel abgezogen und das Sol-Gel noch vor der endgültigen Vernetzung getrocknet. Auf diese Weise entsteht eine dichte nichtporöse Glasmatrix. Biomoleküle sowie chemische

~~Verbindungen können in diese dichte Matrix nicht eindringen und beeinflussen damit nicht~~ die Lumineszenzeigenschaften der eingebauten Farbstoffe. Es wurden inerte phosphoreszierende Sol-Gel Gläser mit den Farbstoffen Ruthenium(II)-tris-1,10-phenanthrolin sowie Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin mit Farbstoffgehalten bis zu 40 mM (bezogen auf kg SiO<sub>2</sub>) nach diesem Verfahren hergestellt. Diese Materialien zeichnen sich durch intensive Raumtemperaturphosphoreszenz aus, die durch Sauerstoff nicht gelöscht wird. Da im Herstellungsprozess die Sol Gel Phosphore entweder in monolithischer Form oder als dünne Filme entstehen müssen, Mikropartikel durch anschließendes Pulverisieren hergestellt werden. Anschließend Silanisierung der Partikel führt zu reaktiven Oberflächen, die zum kovalenten Koppeln von Biomolekülen genutzt werden können. Die Oberfläche der Partikel kann sowohl mit Amino, Epoxy oder Carboxylgruppen versehen werden.

Eine Alternative zur Herstellung von inerten Phosphoreszenzpartikeln besteht darin, organische Polymere als Einbettungsmatrix zu verwenden, die sich zum einen durch eine sehr geringe Gaspermeabilität (zum Ausschluss von Sauerstoff) und zum anderen durch eine minimale Wasseraufnahme (um das Eindringen ionischer Verbindungen zu verhindern) auszeichnen. Geeignete Polymere sind Polyvinylchlorid, Polyvinylidenchlorid und insbesondere Polyacrylnitril.

Polyacrylnitril besitzt eine extrem geringe Gaspermeabilität, teilweise hydrophile Eigenschaften und eine sehr geringe Aufnahmekapazität für Wasser (ca. 1%). Außerdem können die Nitrilgruppen des Polymers problemlos zu Carboxylgruppen verseift werden, die dann für die kovalente Bindung von diversen Biomolekülen zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund ist Polyacrylnitril die optimale Einbettungsmatrix für Phosphoreszenzfarbstoffe als Basis für inerte Nano- und Mikropartikel.

Die Herstellung phosphoreszierender Mikro- und Nanopartikel auf der Basis von Polyacrylnitril (PAN) kann auf verschiedenen Wegen erfolgen.

**BEST AVAILABLE COPY**

- A. Ausfällung der Partikel aus einer Lösung von PAN in Dimethylformamid durch kontrolliertes Zutropfen von Wasser. Die Polymerlösung enthält gleichzeitig den gelösten Phosphoreszenzfarbstoff.
- B. Ausfällung der Partikel aus einer Lösung von PAN in Dimethylformamid durch kontrolliertes Zutropfen von Wasser. Die Polymerlösung enthält keinen gelösten Phosphoreszenzfarbstoff. Der Phosphoreszenzfarbstoff wird nachträglich durch Diffusion in die Partikel eingetragen.
- C. Herstellung der Partikel durch Sprühen einer PAN/Dimethylformamidlösung, die den gelösten Phosphoreszenzfarbstoff enthält in Wasser oder Ethanol.

---

In allen Vorschriften kann der Durchmesser der Partikel durch Veränderung des Anteils an Polyacrylamid in der Dimethylformamidlösung gezielt eingestellt werden. Mit abnehmendem Anteil an Polyacrylamid reduziert sich auch der Durchmesser der Partikel. Es können Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 50 nm hergestellt werden.

Nach der Herstellung und Isolierung der phosphoreszierenden Mikro- und Nanopartikel erfolgt die Aktivierung der Oberfläche mit reaktiven Carboxylgruppen. Dies erfolgt durch Verseifung der oberflächengebundenen Nitrilgruppen in konzentrierter Natronlauge.

Die Carboxylgruppen werden aus zwei Gründen benötigt. Zum einen können so stabile Dispersionen in gepufferten Systemen hergestellt werden und zum anderen Biomoleküle an der Oberfläche kovalent gebunden werden.

Die Mikro- und Nanopartikel können zum einen als phosphoreszierende Referenzstandards zur Konvertierung von Intensitätssignalen in Phasensignale und zum anderen als Phosphoreszenzmarker für die hochempfindliche Detektion von Biomolekülen eingesetzt werden.

---

## Herstellungsvorschriften

### *Herstellung von phosphoreszierenden Nanopartikeln aus Polyacrylnitril und Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthrolin*

Ein Gramm n-Polyacrylnitril wird zusammen mit 10 Milligramm Ruthenium(II)-tris-4,7-diphenyl-1,10 phenanthrolin Perchlorat in 100 ml Dimethylformamid gelöst und in ein 1 l Becherglas gefüllt. Zu dieser Lösung wird 400 ml H<sub>2</sub>O unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Es entsteht eine leichte Trübung in der Lösung. Anschließend wird 10 ml einer 5%igen Natriumchloridlösung ebenfalls unter ständigem Rühren zugegeben. Dabei entsteht ein flockiger Niederschlag, der sich über Nacht am Boden des Becherglases absetzt. Dieser Niederschlag enthält den gesamten Farbstoff und wird durch Zentrifugieren abgetrennt und



anschließend dreimal mit 250 ml einer 0,5%igen NaCl-Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt wird der Niederschlag mit 200 ml Ethanol gewaschen, um den an der Oberfläche adsorbierten Phosphoreszenzfarbstoff vollständig auszuwaschen. Der Ethanol wird durch Zentrifugieren vom Niederschlag abgetrennt. Anschließend erfolgt ein letzter Waschschrift in einer 0,05%igen NaCl-Lösung. Der Niederschlag, der die Nanopartikel enthält, wird abgetrennt und in 50 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### ***Herstellung von phosphoreszierenden Nanopartikeln aus Polyacrylnitril und Ruthenium(II)-tris-1,10 phenanthrolin***

~~Ein Gramm n-Polyacrylnitril wird zusammen mit 10 Milligramm Ruthenium(II)-tris-1,10~~  
phenanthrolin Hexafluorophosphat in 100 ml Dimethylformamid gelöst und in ein 1 l Becherglas gefüllt. Zu dieser Lösung wird 400 ml H<sub>2</sub>O unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Es entsteht eine leichte Trübung in der Lösung. Anschließend wird 10 ml einer 5%igen Natriumchloridlösung ebenfalls unter ständigen Rühren zugegeben. Dabei entsteht ein flockiger Niederschlag, der sich über Nacht am Boden des Becherglases absetzt. Dieser Niederschlag enthält ca. 90% des eingesetzten Farbstoffs und wird durch Zentrifugieren abgetrennt und anschließend dreimal mit 250 ml einer 0,5%igen NaCl-Lösung gewaschen. Im nächsten Schritt wird der Niederschlag mit 200 ml Ethanol gewaschen, um den an der Oberfläche adsorbierten Phosphoreszenzfarbstoff vollständig auszuwaschen. Der Ethanol wird durch Zentrifugieren vom Niederschlag abgetrennt. Anschließend erfolgt ein letzter Waschschrift in einer 0,05%igen NaCl-Lösung. Der Niederschlag mit den Nanopartikeln wird abgetrennt und in 50 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### ***Carboxylierung der Oberfläche der phosphoreszierenden Nanopartikel***

10 ml der Partikelsuspension aus Absatz A oder B mit einem Feststoffgehalt von 200 mg Polyacrylnitril wird in 50 ml einer 5%igen NaOH-Lösung aufgenommen. Die Partikelö fallen als flockiger Niederschlag aus. Die Lösung wird für 45 Minuten unter intensiven Rühren auf 75°C erhitzt. Intensiver Geruch nach Ammoniak zeigt die Verseifung der Nitrilgruppen an. Nach Aufklaren der trüben Lösung wird die Natronlauge durch Zugabe von HCl neutralisiert und auf pH 3 eingestellt. Dabei fallen die carboxylierten Partikel wiederum als Niederschlag aus und können abzentrifugiert werden. Abschließend werden sie in 50 ml Puffer pH 3 gewaschen, abzentrifugiert und in 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**